

A61K 8/18 (2006.01) **A61K 8/30** (2006.01)

A61K 8/67 (2006.01) **A61K 8/72** (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01) **A61K 31/74** (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01) **A61Q 19/08** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2005.01.27**

(30) Prioridade(s): **2004.01.29 FR 0400826**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.08.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.31**
039/2009

(73) Titular(es):

PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE
45, PLACE ABEL-GANCE 92100 BOULOGNE-
BILLANCOURT **FR**

(72) Inventor(es):

JEAN-HILAIRE SAURAT **CH**
GÜRKAN KAYA **CH**
PASCAL BORDAT **FR**

(74) Mandatário:

MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA
RUA ARCO DA CONCEIÇÃO, N.º 3, 1º ANDAR 1100-028
LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES TÓPICAS ASSOCIANDO FRAGMENTOS DE HIALURONATO DE SÓDIO E UM RETINÓIDE**

(57) Resumo:

RESUMO

COMPOSIÇÕES TÓPICAS ASSOCIANDO FRAGMENTOS DE HIALURONATO DE SÓDIO E UM RETINÓIDE

Composições destinadas à aplicação tópica caracterizadas por compreenderem, a título de princípio activo, um ou vários fragmentos de hialuronato de peso molecular compreendido entre 50 000 e 750 000 Da e eventualmente um retinóide.

DESCRIÇÃO

COMPOSIÇÕES TÓPICAS ASSOCIANDO FRAGMENTOS DE HIALURONATO DE SÓDIO E UM RETINÓIDE

A presente invenção tem por objecto composições tópicas à base de hialuronato, e respectiva utilização em cosmetologia e em dermatologia.

O hialuronato (HA) é o componente principal da matriz extracelular. Está sobretudo presente nos tecidos conjuntivos ditos «moles», por oposição a outras glicosaminoglicanas como o ácido condroitino-sulfúrico, presente nos tecidos ditos «duros», como a cartilagem. Encontramo-lo assim em quantidades importantes principalmente na pele.

O HA é uma glicosaminoglicana linear não sulfatada composta por unidades repetitivas de D-ácido glucorónico e de N-acetil-D-glucosamina (Tammi R., Agren UM., Tuhkanen AL., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry & Cytochemistry. 29(2):1-81, 1994).

Na pele normal, o HA é sintetizado essencialmente pelos fibroblastos dérmicos e pelos queratinócitos epidérmicos (Tammi, R., já citado). Graças aos seus resíduos que têm carga negativa, o HA desempenha o papel de uma bomba de água que permite manter a elasticidade da pele. O HA tem um papel essencial no controlo da difusão dos alimentos, das hormonas, das vitaminas e dos sais inorgânicos do tecido conjuntivo e na limpeza dos resíduos metabólicos susceptíveis de induzir reacções inflamatórias. Com a idade, a quantidade de HA e o seu grau de polimerização diminuem, dando origem a uma

diminuição da quantidade de água retida no tecido conjuntivo. A pele sofre então um processo de envelhecimento que conduz a um aumento da fibrose e a uma baixa do teor em fibras elásticas.

Na pele humana normal, o HA existe na forma de um polímero de elevado peso molecular (600 000 - 1 000 000 Da). A degradação fisiológica do HA na pele efectua-se por (i) internalização pelos queratinócitos através do CD44 e (ii) fragmentação intracelular em fragmentos de dimensão intermédia pelas hialuronidases (60 000 - 300 000 Da). O HA fragmentado é libertado pelos queratinócitos, atravessa a membrana basal e é libertado directamente nos vasos linfáticos (Tammi R. et al., já citado).

Em situações inflamatórias, a acumulação das formas de baixo peso molecular de HA foi demonstrada no animal. Durante a inflamação, factores quimiotácticos plaquetários como a fibrina estimulam o afluxo e a activação dos fibroblastos que degradam o HA por secreção de hialuronidase, dando origem a concentrações tecidulares elevadas de pequenos fragmentos de HA. A produção destes pequenos fragmentos de HA faz-se também por diversos mecanismos como a despolimerização pelas espécies reactivas de oxigénio libertadas pelos granulócitos, ou na pele irradiada pelos ultravioletas, ou a síntese de novo de fragmentos de baixo peso molecular. Diversos estudos sugeriram que o HA de alto e baixo peso molecular pode ter efeitos biológicos diferentes nas células e nos tecidos (McKee CM., Penno MB., Cowman M., Burdick MD., Strieter RM., Bao C., Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *Journal of Clinical Investigation*. 98(10):2403-13,

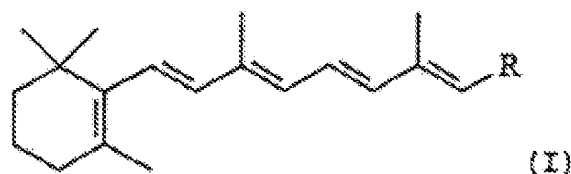
1996; Termeer CC., Hennies J., Voith U., Ahrens T., Weiss JM., Prehm P., Simon JC. Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *Journal of Immunology*. 165(4):1863-70, 2000; Fitzgerald KA., Bowie AG., Skeffington BS., O'Neill LA., Ras, Protein Kinase C zeta, and I kappa B Kinases 1 and 2 are downstream effectors of CD44 during the activation of NF-kappa B by hyaluronic acid fragments in T-24 carcinoma cells. *Journal of Immunology*. 164(4):2053-63,2000).

Foi demonstrado que o HA de pesos moleculares intermédios (50 000 - 250 000 Da), aplicado na pele murina e humana, atravessa as camadas epidérmicas e dérmicas. Os produtos de degradação aparecem no soro 2 horas após a aplicação do HA sobre a pele. O peso molecular do HA recuperado no soro é ligeiramente inferior ao do HA aplicado sobre a pele, demonstrando assim que a passagem transcutânea do HA não se limita unicamente a fragmentos de dimensão mais pequena (100 - 10 000 Da) (Brown TJ., Alcorn D., Fraser JR. Absorption of hyaluronan applied to the surface of intact skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 113(5):740-6, 1999).

A vitamina A (retinol) e seus derivados naturais e sintéticos, colectivamente designados como retinóides, constituem uma grande variedade de substâncias que têm efeitos acentuados nomeadamente na embriogénese, na reprodução, no mecanismo da visão, na regulação do crescimento e no fenómeno da diferenciação celular (Blomhoff R. et al. 1991, *Physiol. Rev.* 71:951-990; Sporn M.B. et al. (1994) in the *Retinoids*, 2nd Ed. Raven Press, NY).

Os retinóides naturais são definidos pela fórmula geral (I) que se apresenta a seguir, tal como é definida em (IUPAC-IUB

Joint Commission on Biochemical Nomenclature in Eur. J. Biochem. (1982), 129, 1-5):



em que

R = CH₂OH corresponde ao retinol (ROL)

R = CHO corresponde ao retinal (RAL)

R = COOH corresponde ao ácido retinóico (RA)

Os efeitos biológicos dos retinóides são mediados pela sua interação com os receptores nucleares do tipo RAR (receptor do ácido retinóico) e RXR (receptor X do ácido retinóico). O ligando conhecido dos receptores RARs é o isómero trans da forma ácida da vitamina A (ácido trans-retinóico).

Em muitos tipos celulares, incluindo as células epiteliais, o ROL é metabolizado em ésteres de retinil.

A importância dos retinóides em dermatologia remonta às primeiras observações no animal de anomalias cutâneas induzidas por uma deficiência de vitamina A (Wolbach et Howe, J. exp. Med. 43:753).

Hoje em dia, já há numerosos retinóides sintetizados. Os seus domínios principais de utilização continuam a ser as indicações dermatológicas como as queratoses actínicas, o acne e, de uma forma geral, o tratamento por via tópica ou

oral das perturbações de queratinização como a psoríase e a doença de Darier.

Por outro lado, conhece-se um certo número de combinações ou de associações com retinóides:

- combinações de moléculas que actuam sobre a diferenciação celular e a imunomodulação, por exemplo combinação de retinóides e de quimioterapia nos linfomas cutâneos (Thestrup-Petersen et al. Br. J. Dermatol. 118:811-818),
- combinação de retinóides e de fototerapia, por exemplo em associação com os psoralenos (Saurat et al. Dermatologica 177:218-224),
- combinação de moléculas que afectam o metabolismo dos retinóides. É por exemplo o caso da interacção entre os azoles e os derivados da vitamina D, que inibe o metabolismo dos retinóides e permite aumentar os níveis intracelulares de hormona activa (Kato et al., Biochem. J. (1992) 286:755-760, Jugert et al. Skin Pharmacol. 1998).

Por outro lado, sabe-se que um dos principais efeitos secundários dos retinóides quando se efectua uma aplicação tópica continua a ser a irritação induzida. Este efeito pode ser impeditivo da observância do tratamento.

O retinaldeído (RAL), um membro da família dos retinóides, é um metabolito natural da vitamina A, actualmente utilizado em aplicação tópica no homem. Demonstrou-se que o RAL exerce uma actividade biológica na pele induzindo uma hiperplasia epidérmica, do mesmo modo que um nítido aumento da expressão do CD44 e do HA na epiderme folicular e interfolicular dos

ratos C57BL/6 e SKH1 sem pêlo (SKH1 *hairless*). Estes efeitos foram igualmente observados após a aplicação tópica do ácido retinóico (RA) e do retinol (ROL). Porém, a expressão do CD44 e a do HA foram mais fortemente aumentadas nos ratos tratados com RAL do que nos ratos tratados com RA ou com ROL.

O CD44 é uma glicoproteína transmembranar polimórfica que tem várias isoformas geradas pelo entrançamento alternativo e as modificações pós-traducionais. Num estudo recente, demonstrámos que duas funções principais do CD44 na pele murina são (i) a regulação da proliferação queratinocitária em resposta a estímulos extracelulares e (ii) a manutenção da homeostase local do HA (Kaya G., Rodriguez I., Jorcano JL., Vassalli P., Stamenkovic I. Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes & Development*. 11(8):996-1007, 1997). Observámos igualmente uma diminuição da expressão do CD44 epidérmico nos doentes que sofrem de líquen escleroatrófico, que é potencialmente responsável pela deposição dérmica do HA e a atrofia epidérmica nesta doença (Kaya G., Augsburger E., Stamenkovic K., Saurat JH. Decrease in epidermal CD44 expression as a potential mechanism for abnormal hyaluronate accumulation in superficial dermis in lichen sclerosus and atrophicus. *Journal of Investigate Dermatology*. 115(6):1054-8, 2000).

O CD44 está envolvido nas interacções célula-célula e célula-matriz. Um estudo recente põe em evidência que o par formado pelo CD44 e os fragmentos de HA (CD44-HAF) é indutor de mitoses e de neossíntese de HA (Laurent TC, Laurent UB,

Fraser JR. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol* 79(2): 1-7, 1996). Os efeitos epidérmicos e dérmicos do HA e do RAL parecem assim ser mediados pelo CD44.

Actualmente existem preparações farmacêuticas e cosméticas contendo sais inorgânicos do HA de alto peso molecular, nomeadamente Healon, Hyalgan, Provisc, Vitrax e os citados em Martindale The Complete Drug reference, 32^a edição, 1999, The Pharmaceutical Press Editor.

Contudo, o HA passa dificilmente através da pele, dado o seu peso molecular elevado.

Por esta razão, no pedido internacional WO 02/076470 A1, os autores propõem uma composição que associa a N-acetilglucosamina a um retinóide. Esta combinação permite aumentar de forma sinérgica a síntese de ácido hialurónico pelas células epidérmicas *in vitro*. Não é referido nenhum resultado obtido após aplicação da formulação *in vivo*.

O pedido japonês 11279042 descreve composições à base de fragmentos de ácido hialurónico sulfatado, fragmentos estes tendo de preferência um peso molecular compreendido entre 1 000 e 50 000 Da, ocupando os grupos sulfatos 10 a 90% do conjunto dos substituintes R1, R2, R3 e R4 na fórmula. Estes fragmentos de baixo peso molecular são muito activos para manter a elasticidade da pele e evitar a queratinização. Pelo contrário, fragmentos de ácido hialurónico não sulfatados revelaram-se inactivos no teste.

O pedido internacional WO 01/03657 A1 descreve uma composição que permite evitar o envelhecimento prematuro da pele em boa condição, contendo retinol e um hialuronato de peso molecular compreendido entre 1 e 1 000 000 Da.

O pedido internacional WO 2005/039532 A1 descreve composições, que podem ser aplicadas de forma tópica, sob a forma de micro-emulsões e contendo um retinóide, como o ácido 13-cis-retinóico, como agente activo, em combinação com um derivado do ácido hialurónico tendo uma massa molecular compreendida, de preferência, entre 400 e 1 000 000 Da e em especial entre 400 e 200 000 Da.

O pedido EP 0 197 718 descreve a utilização de fragmentos hialurónicos de peso molecular compreendido entre 50 000 e 750 000 Da em associação com uma outra substância activa dermatologicamente.

Ora os inventores mostraram, surpreendentemente, que o HA não sulfatado hidrolisado em fragmentos de pesos moleculares compreendidos entre 50 000 e 750 000 Da possuem uma actividade biológica na pele que é amplificada quando estes fragmentos são associados ao retinal.

A presente invenção tem, assim, por objecto composições destinadas a aplicação tópica caracterizadas por compreenderem, a título de princípio activo, um ou mais fragmentos de hialuronato de baixo peso molecular, compreendido entre 50 000 e 750 000 Da, e por compreenderem, além disso, retinal.

Num modo de realização preferido da invenção, o peso molecular dos fragmentos de hialuronato está compreendido entre 50 000 e 250 000 Da ou entre 250 000 e 750 000 Da.

A combinação de fragmentos de hialuronato de peso molecular compreendido entre 50 000 e 750 000 Da com o retinal tem um efeito sinérgico sobre a síntese do ácido hialurónico pelos queratinócitos.

Entendemos por hialuronato qualquer sal, nomeadamente o hialuronato de sódio.

As composições tópicas de acordo com a invenção podem conter igualmente corantes, óleos de silicone, retinóides ou pigmentos corantes, antissépticos, óleos vegetais, antioxidantes, sais minerais, espessantes, modificadores de pH, agentes absorventes dos raios ultravioletas, vitaminas ou qualquer outro excipiente aceitável em dermatologia e em farmácia.

As composições de acordo com a invenção podem ser utilizadas em cosmetologia e em dermatologia para prevenir ou melhorar peles enrugadas, peles secas... e permitem manter a firmeza e a humidade da pele.

As composições de acordo com a invenção podem ser utilizadas em preparações tópicas, no domínio da dermatologia ou da cosmetologia, com o objectivo de prevenir ou tratar dermatoses associadas a uma atrofia do tecido cutâneo e para as quais será necessário melhorar o estado de hidratação da pele, diminuir a atrofia cutânea, como por exemplo nos efeitos secundários dos tratamentos corticóides, diminuir as

rugas, lutar contra o envelhecimento cutâneo fotoinduzido ou não, relançar a actividade celular epidérmica e dérmica, reafirmar a pele, aumentar a sua elasticidade.

A invenção é ilustrada por exemplos e figuras que se apresentam a seguir.

A figura 1 representa a quantidade de HA medida na epiderme nos animais não tratados ou animais tratados duas vezes por dia pela preparação 5, a preparação 3 ou a preparação 7, obtidas segundo os modos operatórios descritos nos exemplos 1 e 2.

A figura 2 representa a dosagem do HA na derme nos animais não tratados ou tratados com a preparação 5, 3 ou 7, preparadas como nos exemplos 1 e 2.

EXEMPLO COMPARATIVO 1: Efeito dos fragmentos de hialuronato utilizados por via tópica

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Preparações

Foram avaliados 3 tipos de fragmentos de hialuronato (HAF):

- HAF de muito alto peso molecular (1 000 000 - 2 000 000 Da)
- HAF de baixo peso molecular (50 000 - 750 000 Da)
 - HAF (250 000 - 750 000 Da)
 - HAF (50 000 - 250 000 Da)
- HAF de muito baixo peso molecular (1 000 - 20 000 Da)

Estes fragmentos foram incluídos nas preparações cosméticas clássicas, de que se apresentam dois exemplos de composição no quadro 1:

Ingredientes	Quantidades %	Quantidades %
PEG 600	5	-
PEG 400	-	1
Sorbitol	-	2
Glicerina	-	10
BHT	0,02	-
Lauril sulfato de sódio	-	0,25
Carbopol	1	-
Vitamina E acetato	0,5	-
Branco de baleia	-	6
Álcool cetostearílico	-	3
Óleo de vaselina espessa	5	-
Cremonfor RH 40	2	-
Ácido sórbico	0,05	-
Nipagin	0,15	-
Fenonip		1
Trietanolamina	2,48	-
Água	qsp 100	qsp 100

1.2 Medida da actividade dos HAF

Utilizam-se ratos SKH1 sem pêlo (SKH1 *hairless*) à razão de 3 animais por grupo.

As diferentes preparações são aplicadas por via tópica.

Mede-se a espessura epidérmica com uma ocular graduada (Zeiss); ampliação 40 vezes; faz-se a média dos 5 campos por rato.

Avalia-se a celularidade dérmica calculando o número de células dérmicas; ampliação 40 vezes; faz-se a média de 5 campos por rato.

O número de células proliferantes da epiderme e da derme é posto em evidência pela imunomarcção de Ki-67 com um anticorpo anti Ki-67 (ratizona anti-rato, Dako).

A presença de hialuronato na derme mede-se após a aplicação das diferentes preparações à razão de duas aplicações por dia de acordo com a técnica ELISA (Corgenix) e o hialuronato é posto em evidência em cortes histológicos pela coloração com ferro coloidal.

2. RESULTADOS

2.1 Efeitos sobre a espessura epidérmica, a celularidade dérmica e o número de células proliferantes

Os resultados estão reunidos nos quadros 2 e 3.

As preparações 2 e 3 formuladas com HAF de baixo peso molecular de acordo com a invenção e aplicadas por via tópica aumentam de forma significativa a espessura epidérmica e a celularidade dérmica no rato SKH1 sem pêlo (SKH1 *hairless*), em relação às preparações 1 e 4 contendo respectivamente HAF de alto e muito baixo peso molecular (quadro 2). A preparação 3 aumenta também de forma significativa o número de células proliferantes da epiderme e da derme no rato SKH1 sem pêlo (SKH1 *hairless*), em relação às preparações 1 e 4 (quadro 3).

A aplicação tópica das preparações 2 e 3 induz uma celularidade aumentada na derme superficial e profunda. As células que são aumentadas em número são principalmente fibroblastos que apresentam um fenótipo de activação com um retículo endoplásmico bem desenvolvido.

2.2 Efeitos sobre o nível de HA na derme

Os resultados estão reunidos no quadro 4.

A presença de HA na derme foi detectada para as preparações 2 e 3 (preparação 3 > preparação 2).

O nível de HA não é detectável após a aplicação das preparações 1 e 4.

Assim, os inventores mostraram que a aplicação tópica de HAF de baixo peso molecular tem duas consequências principais:

1. Hiperplasia epidérmica importante acompanhada de um aumento da proliferação celular.
2. Acumulação focal do HA na derme superficial com um aumento importante do número de fibroblastos:

consequências que não se observam com os HAF de alto ou muito baixo peso molecular.

EXEMPLO 2: Efeito da associação do retinal com HAF de baixo peso molecular

1. MATERIAIS E MÉTODOS

Os fragmentos do quadro 5 são incluídos nas preparações cosméticas clássicas como as exemplificadas atrás.

2. RESULTADOS

Estão reunidos nos quadros 6 e 7 e nas figuras 1 e 2. A aplicação tópica das preparações 6 e 7 aumenta o número de focos de epiderme espessada.

O efeito da aplicação do RAL isoladamente (preparação 5) é comparável ao efeito obtido com a preparação 8, que associa HAF de baixa dimensão molecular com o RAL, prova que não existe sinergia entre RAL e fragmentos de muito baixo peso molecular.

O efeito sinérgico da associação HAF-RAL é particularmente visível ao nível da celularidade dérmica para as preparações 6 e 7 (cf. quadro 5).

A aplicação tópica das preparações 6 e 7 aumenta igualmente a coloração de HA dérmico (preparação 7 > preparação 6) (cf. quadro 7).

O efeito sinérgico da associação HAF-RAL foi igualmente posto em evidência por dosagem ELISA da presença de HA na derme e na epiderme de ratos tratados pelas diferentes preparações referidas acima.

Os resultados mostram um aumento significativo da produção de HA, tanto na derme (figura 2) como na epiderme (figura 1)

após tratamento pela associação HAF-RAL (preparação 7) em comparação com o tratamento por RAL isoladamente (preparação 5) ou HAF isoladamente (preparação 3).

17-02-2009

REIVINDICAÇÕES

1. Composições destinadas à aplicação tópica **caracterizadas por** compreenderem, a título de princípio activo, um ou vários fragmentos de hialuronato de peso molecular compreendido entre 50 000 e 750 000 Da e **por** conterem, além disso, retinal.
2. Composições de acordo com a reivindicação 1 **caracterizadas por** o peso molecular dos fragmentos de hialuronato estar compreendido entre 50 000 e 250 000 Da ou entre 250 000 e 750 000 Da.
3. Utilização de uma composição de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 2 em cosmetologia.
4. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3 a título de medicamento utilizável em dermatologia.
5. Composição farmacêutica **caracterizada por** conter, a título de princípio activo, um ou vários fragmentos de hialuronato de peso molecular compreendido entre 50 000 e 750 000 Da e **por** conter, além disso, retinal, associados a excipientes farmacêuticamente aceitáveis.
6. Utilização de uma composição de acordo com qualquer das reivindicações 1 e 2, ou 4 e 5, para a preparação de um medicamento destinado ao tratamento ou à prevenção da atrofia do tecido cutâneo, do envelhecimento cutâneo foto-induzido ou não.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 3 **caracterizada por** a composição ser utilizada para a atrofia do tecido

cutâneo, a melhoria do estado de hidratação da pele, a diminuição das rugas ou o reafirmar da pele.

17-02-2009

QUADRO 1: Preparações à base de HAF

Tipo de fragmento	Preparação 1	Preparação 2	Preparação 3	Preparação 4
HAF (1 000 000-2 000 000 Da)	0,2%	-	-	-
HAF (250 000-750 000 Da)	-	1%	-	-
HAF (50 000-250 000 Da)	-	-	0,2%	-
HAF (1 000-20 000 Da)	-	-	-	0,2%

QUADRO 2: Efeitos dos HAF

Preparação	Espessura epidérmica (mm)	Celularidade dérmica (c/campos)
Controlos	0,07±0,02	96±8
Preparação 1	0,14±0,02	99±2
Preparação 2	0,17±0,01	193±4
Preparação 3	0,32±0,06	257±6
Preparação 4	0,11±0,02	99±4

QUADRO 3: Efeitos dos HAF

Preparação	Ki-67 epidérmico (c/campos)	Ki-67 dérmico (c/campos)
Controlos	26±1	0,95±0,6
Preparação 1	28±4	1±0,2
Preparação 2	ND*	ND
Preparação 3	96±9	5±1
Preparação 4	27±1	1±0,3

*ND: não determinado

QUADRO 4: Efeitos dos HAF sobre a presença de HA na derme

Preparação	Presença de HÁ na derme posta em evidência pela coloração com ferro coloidal
Controlos	-
Preparação 1	-
Preparação 2	++++
Preparação 3	+++++
Preparação 4	-

QUADRO 5: Preparações à base de HAF e de retinal

Fragmentos	Preparação 5	Preparação 6	Preparação 7	Preparação 8
HAF (250 000-750 000 Da)	-	1%	-	-
HAF (50 000-250 000 Da)	-	-	0,2%	-
HAF (1 000-20 000 Da)	-	-	-	0,2%
Retinaldeído (RAL)	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%

QUADRO 6: Estudo do efeito sinérgico dos HAF e do RAL sobre a espessura epidérmica e a celularidade dérmica

Preparação	Espessura epidérmica (mm)	Celularidade dérmica (c/campos)
Controlos	0,07±0,02	96±8
Preparação 5	0,17±0,02	98±4
Preparação 6	0,17±0,04	195±3
Preparação 7	0,33±0,01	258±5
Preparação 8	0,19±0,02	97,6±1

QUADRO 7: Detecção da presença de HA na derme após aplicação dos HAF-RAL

Preparação	Presença de HÁ na derme posta em evidência pela coloração com ferro coloidal
Controlos	-
Preparação 5	-
Preparação 6	+++++
Preparação 7	+++++
Preparação 8	-

Figura 1: Dosagem do HA na epiderme

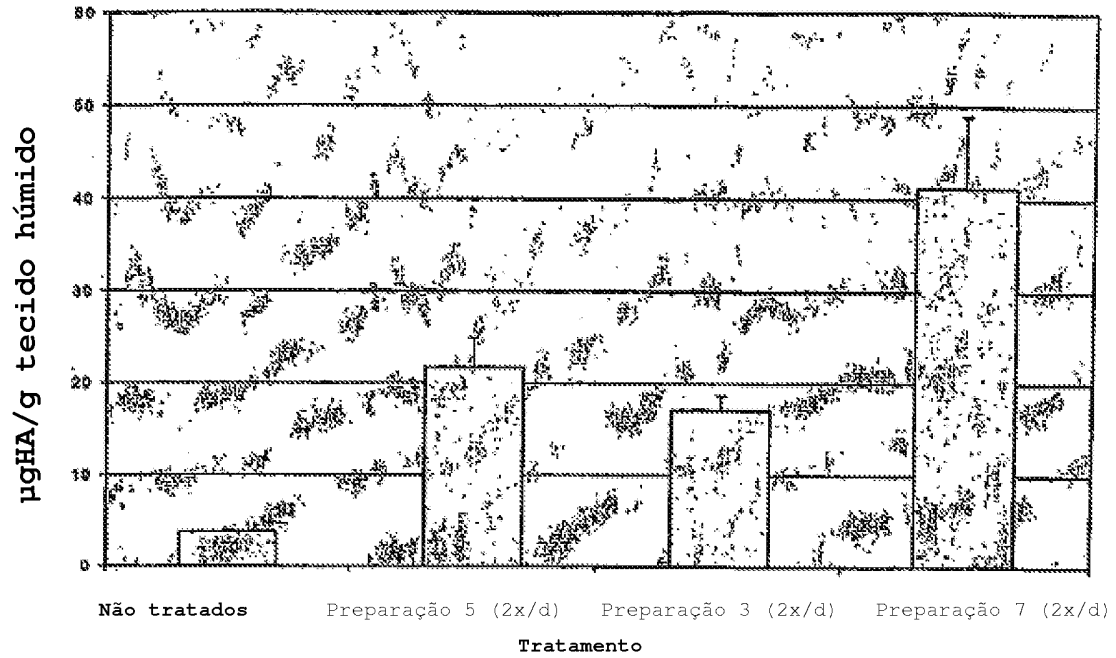


Figura 2: Dosagem do HA na derme

